

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 10-245402

Date of Laid-Open: September 14, 1998

Application No. 9-65373

Filing date: March 4, 1997

Applicant: Zaidanhōjin Noguchi Kenkyusho

Inventors: Katsuji Haneda et al.

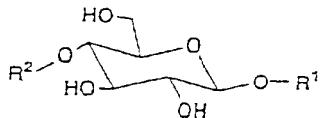
Title of the Invention:

A novel sugar chain-alkylglycoside derivative and a method for producing the same

Claims:

1. An alkylglycoside derivative having an asparagine type sugar chain.
2. A novel alkylglycoside derivative having an asparagine type sugar chain represented by the following formula (1):

[1]



in which R¹ represents a n-alkyl group, and R² represents a complex-type sugar chain, a high mannose type sugar chain, or a hybrid type sugar chain.

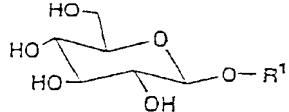
3. The compound of claim 2, wherein in the formula (1), R¹ is a n-alkyl group having C₅ to C₁₂, and the sugar chain represented by R² is a hybrid type sugar chain of (NeuAc-Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc) or (Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc), or a high mannose type sugar chain of (Man)₅-(GlcNAc), in which NeuAc represents N-acetylneurameric acid, Gal represents D-galactose,

GlcNAc represents N- acetyl-D-glucosamine, and Man represents D-mannose.

4. The compound of claim 2, wherein in the formula (1), R¹ is a n-octyl group (C₈), and the sugar chain represented by R² is a hybrid type sugar chain of (NeuAc-Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc) or (Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc).

5. A method for producing a novel sugar chain-alkylglycoside derivative represented by the formula (1) comprising transferring a glycoconjugate to an alkylglycoside represented by the following formula (2):

[2]



in which R¹ represents the same meaning as the formula (1), in the presence of endoglycosidase.

6. The method of claim 5, wherein the endoglycosidase is endo- β -N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.96).

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-245402

(43)公開日 平成10年(1998)9月14日

(51)Int.Cl.⁶
C 0 8 B 37/00
C 1 2 P 19/44

識別記号

F 1
C 0 8 B 37/00
C 1 2 P 19/44

G

審査請求 未請求 請求項の数 6 FD (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平9-65373

(71)出願人 000173924
財団法人野口研究所
東京都板橋区加賀1-8-1
(72)発明者 羽田勝二
東京都板橋区中台3-27-1-1311
(72)発明者 山本憲二
滋賀県大津市仰木の里東6-9-3
(72)発明者 熊谷英彦
滋賀県大津市日吉台3-32-2

(22)出願日 平成9年(1997)3月4日

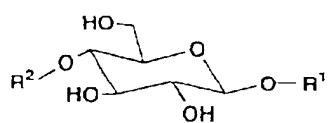
(54)【発明の名称】 新規糖鎖-アルキルグリコシド誘導体およびその製造法

(57)【要約】

【目的】 ナニオン系界面活性剤であるアルキルグリコシドにアスパラギン結合型糖鎖を付けた新規なアルキルグリコシド誘導体を提供する。

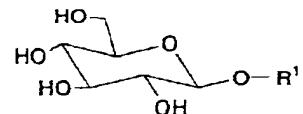
【構成】 1) 下記式(化1)で示されるアスパラギン結合型糖鎖を有する新規アルキルグリコシド誘導体

【化1】

(式中、R¹はC₅乃至C₁₂からなるn-アルキル基を示す。R²は複合型糖鎖、高マンノース型糖鎖あるいは混成型糖鎖を示す。)

2) エンドoglコシダーゼの存在下、複合糖質の糖鎖を下記式(化2)で示されるアルキルグリコシド誘導体に転移させることにより(化1)に示す糖鎖を有する新規アルキルグリコシド誘導体を製造する方法。

【化2】

[式中、R¹は(化1)と同じ内容を示す。]

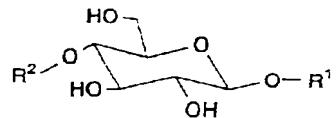
【効果】 アルキルグリコシド系の界面活性剤に複合糖質の糖鎖を付与することにより新しいタイプの界面活性剤を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】アスパラギン結合型糖鎖を有するアルキルグリコシド誘導体

【請求項2】下記式(化1)で示されるアスパラギン結合型糖鎖を有する新規アルキルグリコシド誘導体

【化1】



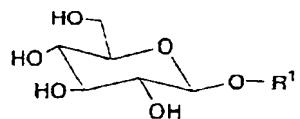
(式中、R¹はn-アルキル基を示す。R²は複合型糖鎖、高マンノース型糖鎖あるいは混成型糖鎖を示す。)

【請求項3】(化1)の化合物のR¹がC₅乃至C₁₂からなるn-アルキル基、R²で示される糖鎖が、(NeuAc-Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc)あるいは(Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc)からなる複合型糖鎖、あるいは(Man)₆-(GlcNAc)からなる高マンノース型糖鎖である請求項2に記載の化合物。但し、NeuAcはN-アセチルノイロミン酸、GalはD-ガラクトース、GlcNAcはN-アセチル-D-グルコサミン、ManはD-マンノースを示す。

【請求項4】(化1)の化合物のR¹がn-オクチル基(C₈)、R²で示される糖鎖が、(NeuAc-Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc)あるいは(Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc)からなる複合型糖鎖である、請求項2に記載の化合物。

【請求項5】エンドグリコシターゼの存在下、複合糖質の糖鎖を下記式(化2)で示されるアルキルグリコシド誘導体

【化2】



(式中、R¹は(化1)と同じ内容を示す。)に転移させることにより(化1)に示される新規糖鎖-アルキルグリコシド誘導体を製造する方法。

【請求項6】エンドグリコシターゼがエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(EC 3.2.1.96)である請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規糖鎖-アルキルグリコシド誘導体、およびその製造法に関する。本発明は新しい界面活性剤等として応用される。

【0002】

【従来の技術】糖質および複合糖質は生物の細胞、体液等に糖タンパク質あるいは糖脂質等の形で存在し、細胞の基質認識や細胞-細胞間の認識等に関わっている。糖タンパク質では糖鎖が通常アスパラギン結合型糖鎖として、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を介してアスパラギン(Asn)に結合するが、あるいはムチン型糖鎖としてN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を介してセリンあるいはトレオニン(Ser, Thr)に結合している。

【0003】糖脂質は動物組織ではセラミドと呼ばれる脂質部分に糖鎖がグルコース(Glc)を介して結合したスフィンゴ糖脂質として存在する。

【0004】アスパラギン結合糖鎖は(NeuAc-Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc)₂あるいは(Gal-GlcNAc)₂-(Man)₃-(GlcNAc)₂といった複合型糖鎖あるいは(Man)₆-(GlcNAc)₂といった高マンノース型糖鎖として存在する。ここで、NeuAcはN-アセチルノイロミン酸、GalはD-ガラクトース、GlcNAcはN-アセチル-D-グルコサミン、ManはD-マンノースを示す。

【0005】一方、アルキルグリコシド誘導体は疎水性のアルキル部分と親水性の糖を合わせ持つことからノニオン界面活性剤として利用されている。

【0006】それらの糖部分は通常1~2個であり、アスパラギン結合型糖鎖のような数種類の異なる糖が糖鎖として付いたようなものはない。

【0007】複雑な糖鎖をもつアルキルグリコシド誘導体を化学的に合成することは極めて困難であるが、糖鎖の加水分解酵素であるエンドグリコシダーゼの中には糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖ブロックを転移させる活性を有するものがある。

【0008】エンドグリコシダーゼを用いた糖鎖転移反応としては、K. タケガワ(K. Takegawa)ら「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)」第270巻、第3094~3099頁(1995)がマルスロバクタープロトホルミエ(Arthrobacter protophormiae)由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド-A)による糖質への糖鎖転移反応を、また、K. ヤマモト(K. Yamamoto)ら「バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.)」第203巻、第244~252頁(1994)はムコールセエマリス(Mucor hiemalis)由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド-B)による糖質への糖鎖転移反応を報告した。また、K. ハネダ(K. Haneda)ら「カーボハイドロート・リサーチ・Carbohydr. Res.」第292巻、第61~70頁(1996)はGlcNAc残基を有する合成基質への糖鎖転移反応を報告した。

【0009】また羽田も【特願平8-223105号】

はG 1 c N A cのみならずグルコース(G 1 c)が糖鎖受容体になることを示した。

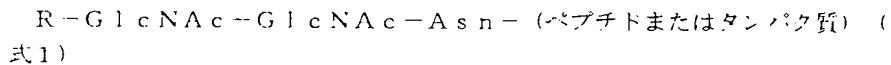
【0010】

【発明が解決しようとする課題】アルキルグリコシドにシアロ複合型等のアスパラキン結合型糖鎖の結合した糖鎖-アルキルクリコシトを合成すれば親水性の増した、また従来のニオノ界面活性剤には無かつた糖鎖の特性を生かした新たな界面活性剤になることが期待できる。

【0011】

【課題を解決するための手段】アルキルグリコシドを受容体にしてエントグリコシダーゼによる糖鎖転移反応を用いる酵素法により、その糖残基に糖鎖を転移させて新しいアスパラキン結合型糖鎖を有するアルキルグリコシド誘導体を合成することが考えられる。即ち、本発明の目的はこのような方法により合成された(化1)に示す糖鎖を有するアルキルグリコシド誘導体を提供するものである。

【化1】(式中R¹はn-アルキル基を示す。R²は複合型糖鎖、高マンノース型糖鎖あるいは混成型糖鎖を示す。)



(式中Rは複合糖鎖を示す)のアスパラキン(A s n)結合型糖鎖のアセチルキトビオース部分(G 1 c N A c - G 1 c N A c)の間を加水分解するが、この時に糖鎖受容体である(化2)に示すアルキルグリコシド誘導体を存在させると、受容体に糖鎖(R - G 1 c N A c)部分が転移し、(化1)に示す目的物質が合成される。

【0015】糖鎖供与体としては複合型糖鎖、高マンノース型糖鎖あるいは混成型糖鎖を持つ糖質を用いることにより各々に対応する糖鎖を持つ(化1)に示す目的物質を得ることが出来る。

【0016】本発明に用いる糖鎖供与体としては、シアル酸を含有する複合型糖鎖は、例えばヒトトランスフェリンや牛フェソンあるいは卵黄等からプロナーゼ等のプロテアーゼ処理とセファデックスG-25によるケルルを繰り返して調製される。ニアドーゼ処理等によりシアル酸を除せばアントシアロ複合型糖鎖が調製される。高マンノース型糖鎖は例えば卵白アルブミン等から同様に処理した後にDowex 50イオノ交換樹脂により精製して調製される。酵素的あるいは化学的に修飾された糖鎖、あるいは化学合成された糖鎖も用いることができる。卵黄あるいは卵白はこれら糖鎖の安価な工業的供給源である。

【0017】本明記の反応は、基質の糖鎖供与体、糖鎖受容体および酵素エントグリコシダーゼを緩衝液液中に混ぜることにより行われる。糖鎖供与体の濃度を1.0 mM以上、望ましくは1.5~7.5 mM、糖鎖受容体の濃度を2.5 mM以上、望ましくは7.5~20 mMになるようにする。酵素量は5.0~10 μmol/(供与体)

【0012】

【発明の実施の形態】本発明を概説すれば、本発明は、(化2)に示すアルキルクリコシト誘導体への酵素エントグリコシダーゼによる糖鎖の転移反応による(化1)に示すアスパラキン結合型糖鎖を有するアルキルグリコシド誘導体の合成である。

【化2】[式中、R¹は(化1)と同じn-アルキル基を示す。]

【0013】糖鎖受容体となる式(化2)に示すアルキルグリコシド誘導体は糖とn-アルカノールから常法により合成して用いられる。通常、糖はD-グルコース(G 1 c)、n-アルカノールはC₅乃至C₁₂の鎖長のものが用いられ、これらは市販品として入手出来る。

【0014】本発明に用いるエントグリコシダーゼとしては、エンドーβ-N-アセチルグルコサミナーゼ(EC 3.2.1.96)であり、例えば、ムコールヒエマリス(*Mucor hiemalis*)由来のエンドーMやアルスロバクター・プロトホルミエ(*Arthrobacter protophormiae*)由来のエンドーA等が用いられる。該酵素は下記式(式1)：

以下、望ましくは8.0~40.0 U/mmol(供与体)程度に制限し、例えば、エンドーMの場合、2~10 mU/mM程度の量で用いる。緩衝液としては、pH 5~8程度、濃度5~20.0 mM、望ましくは1.0~10.0 mMの適当な緩衝液が用いられる。エンドーMの場合、通常pH 5.5~6.5、濃度2.0~10.0 mMの酢酸あるいはリン酸緩衝液中で反応が行われる。

【0018】反応温度は通常、室温~50°C程度、好ましくは30~40°Cで行われ、反応時間は1~24時間である。例えば、エンドーM酵素の場合、通常、37°Cで3~18時間程度反応が行われる。

【0019】酵素反応液中の反応生成物の分析は通常、薄層クロマトグラフィーを用い、展開後オルソノルースulf酸試薬による発色スポットとして検出され、フキャナーで読み取り数値化される。また高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行われ、例えば、C₁₈の逆相系(ODS)カラムを用い、0.05%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含む水-アセトニトリル系溶媒で展開し、214 nmの紫外光吸収により検出される。

【0020】生成した糖鎖-アルキルクリコシト誘導体は公知の手段に従って反応終了後から容易に分離精製することが出来る。例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等により反応終了後から反応生成物の糖鎖-アルキルクリコシト誘導体を分離し、更に濃縮、凍結乾燥等を行えばよい。

【0021】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明を更に具体的に

説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0022】

【実施例1】

n-アルキル- β -D-グルコピラノシドへの糖鎖転移反応

(1) 糖鎖受容体：(化2)に示す炭素数5～8、10、12のアルキル鎖の*n*-アルキル- β -D-グルコピラノシド(市販品)を用いた。

【0023】(2) 糖鎖供与体の調製：ヒトトランスクエリシン(生化学工業)をプロナーゼ処理、セファデックヌG-25ケルロ過を繰り返してAsn残基のみを有するシアロ糖ペプチド【TF-SGP, (NeuAc-Gal-GlcNAc)₂-Man₃-(GalNAc)₂-Asn(分子量2338)】を調製した。

【0024】(3) 糖鎖転移反応：シアロ糖ペプチド(TF-SGP) 500 nmol(終濃度2.5 mM)と炭素数5～8、10および12からなる*n*-アルキル- β -D-グルコピラノシド 250 nmol(同1.2.5 mM)を100 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)12 μ lに溶解し、エント-180 μ Uを含む酵素溶液8 μ lを加え、37°Cで12時間反応させた。100°C、3分間加熱処理して反応停止後、反応液をTLC(シリカゲル)プレートにスポットし、クロロホルム/メタノール/0.2%CaCl₂(16:16:5, v/v/v)溶液中で展開した。展開後、オルシノール-硫酸試薬を用いた検出法により分析した。その結果、糖鎖供与体からC₅～C₁₂の*n*-アルキル- β -D-グルコピラノシドへの糖鎖の転移反応の主生成物であるジシアロ複合型2本鎖糖鎖の転移生成物のスポットが検出され、他にシアル酸の1つ外れたモノシアロ複合型糖鎖およびシアル酸の2つ外れたアシアロ複合型糖鎖の転移生成物に相当するスポットが検出された。主生成物であるジシアロ複合型2本鎖糖鎖の各*n*-アルキルグリコシドへの転移生成物のTLCにおけるR_f値は各々、*n*-ペチル- β -D-グルコピラノシド(C₆) 0.20, 0.22, *n*-エキソル-3-D-グルコピラノシド(C₆)の場合0.030, *n*-アチル- β -D-グルコピラノシド(C₇)の場合0.041, *n*-オクチル- β -D-グルコピラノシド(C₈)の場合0.052, *n*-デシル- β -D-グルコピラノシド(C₁₀)の場合0.070, *n*-トリデシル- β -D-グルコピラノシド(C₁₂)の場合0.081であった。また、発色アポットをフッキヤナード染み込み、転移生成物量の指標としてR_fの発色度を比較すると、*n*-ペチル- β -D-グルコピラノシド(C₆)への糖鎖転移生成物の強度を1.00とした時、各々9.4(C₆)、8.6(C₇)、8.0(C₈)、5.2(C₁₀)、1.8(C₁₂)であった。

【0025】

【実施例2】

n-オクチル- β -D-グルコピラノシドへのシアロ複合型2本鎖糖鎖の転移生成物：糖鎖供与体として実施例1と同様に調製したシアロ糖ペプチド(TF-SGP)を用い、受容体として*n*-オクチル- β -D-グルコピラノシド(C₈)を用いて、実施例1と同じ反応液組成、同じ手順で12時間反応させた。3分間の加熱処理後、蒸留水380 μ lを加え、メープランフィルター滤過した後に逆相カラムを用いるHPLC【コスモセル5°C-18 ARカラム(φ4.6 x 150 mm), 0.05%TFA, 0～50% (40分) アセトニトリル水溶液, 0.8 ml/分】で214 nmの紫外吸収により分析した。その結果、保持時間2.5、2分に新しいピークが検出された。この溶出区分を凍結乾燥後TLC(シリカゲル)にスポットしてクロロホルム/メタノール/0.2%CaCl₂(4:4:1, v/v/v)で展開し、オルシノール-硫酸試薬による糖検出を行うと、実施例1で認めたと同じジシアロ2本鎖複合型糖鎖の転移生成物と推定されるR_f値のところに発色スポットを認めた。

【0026】先のHPLCの保持時間2.5、2分のピーク溶出区分を分取し凍結乾燥後、TOF-MS分析を行うと、m/z [M+2K]⁺ 2386.5, [M+K]⁺ 2050.8, [M+Na]⁺ 1736.8にイオンピークが認められ、ジシアロ複合型2本鎖糖鎖、モノシアロ複合型2本鎖糖鎖およびアシアロ複合型2本鎖糖鎖の*n*-オクチル- β -D-グルコピラノシドへの転移生成物から想定される質量数に一致した。またシアリダーゼ処理をして末端シアル酸を外した後に質量分析を行うとm/z [M+Na]⁺ 1740.3にアシアロ複合型2本鎖糖鎖の*n*-オクチル- β -D-グルコピラノシドへの転移付加体に相当する単一のピークが検出された。これらの結果から、反応生成物はジシアロ複合型2本鎖糖鎖が*n*-オクチル- β -D-グルコピラノシドに転移付加した化合物(分子量2295, 2)であると同定された。

【0027】

【実施例3】

n-オクチル- β -D-グルコピラノシドへのアシアロ複合型2本鎖糖鎖の転移生成物：糖鎖供与体として先に調製したシアロ糖ペプチド(TF-SGP)をシアリダーゼ処理して末端シアル酸を除いたアシアロ糖ペプチド(TF-ASGP)【(Gal-GlcNAc)₂-Man₃-(GalNAc)₂-Asn(分子量1756)】を用い、受容体として*n*-オクチル- β -D-グルコピラノシド(C₈)を用いて、実施例1と同じ反応液組成、同じ手順で12時間反応させた。3分間の加熱処理後、蒸留水380 μ lを加え、メープランフィルター滤過した後に逆相カラムを用いるHPLC【コスモセル5°C-18 ARカラム(φ4.6 x 150 mm), 0.05%TFA, 0～50% (40分) アセト

ニトリル水溶液、0.8 ml/分]で214 nmの紫外吸収により分析した。その結果、保持時間25.3分に新しいピークが検出された。この溶出区分を凍結乾燥後TLC(シリカゲル)にスポットしてクロロオルム/メタノール(0.2%CaCl₂ (4:4:1, v/v))で展開し、オルソノール-硫酸試葉による糖検出を行うと、実施例1で認めたと同じアンアロ2本鎖複合型糖鎖の転移生成物と推定されるR_f値のところに発色スポットを認めた。

【0028】先のHPLCの保持時間25.3分のピーク溶出区分を分取し凍結乾燥後、TOF-MS分析を行うと、 $m/z [M+Na]^+ 173.6, 7, [M+K]^+$

175.2, 7にイオンピークが認められ、n-オクチル- β -D-グルコピラノシドへのアシアロ2本鎖複合型糖鎖の転移生成物の分子量(171.2, 7)から想定される質量数に一致した。

【0029】

【発明の効果】アルキルグリコシド誘導体にエンドグリコシダーゼの作用により複合糖タンパク質に存在するような糖鎖を転移付加させて合成した糖鎖を有するアルキルグリコシド誘導体は、親水性の増加や親和性といった従来のノニオン界面活性剤にはなかった新たな性質を付与した界面活性剤を提供する。